

**Die Aminosäuren der Galle bei
Gallensteinkranken**

Ursula Schaffry

Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der Chirurgischen Poliklinik der Universität München
Direktor: Professor Dr. H. BRONNER

DIE AMINOSÄUREN DER GALLE BEI
GALLENSTEINKRANKEN

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der Zahnheilkunde
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät der
Ludwig - Maximilians - Universität zu München

vorgelegt von
Ursula Schaffry
aus Hannover

München 1957



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Referent: Professor Dr. H. BRONNER
Dekan: Professor Dr. W. BÜNGELER

Tag der mündlichen Prüfung: 8.10.57

DIE AMINOSÄUREN DER GALLE BEI GALLENSTEINKRANKEN

In den letzten Jahren - seitdem Consden, Gordon und Martin (1944) die Papierchromatographie entwickelten - wurden auch die Aminosäuren der Galle vereinzelt mit dieser Methode dargestellt. Die gefundenen Ergebnisse differierten jedoch, weshalb eine nochmalige Untersuchung durchgeführt wurde.

Bisherige Ergebnisse über die Aminosäuren der Galle

HAMMARSTEN, der 1893 als erster die menschliche Galle auf ihre Bestandteile untersuchte, wies unter anderem darin Glykokoll und Taurin in Verbindung mit Gallensäuren und gallensauren Salzen nach. Mit Hilfe chemischer Fällungsmethoden gelang es ihm Taurin und Glykokoll isoliert darzustellen.

1936 fand MÜLLER bei der chemischen Untersuchung von menschlicher Leichengalle: Glykokoll, Lysin, Tyrosin und ein Gemisch von Leucin und Valin, welches sich nicht trennen ließ. Die Durchführung dieser Versuche war sehr schwierig und Müller benötigte dazu große Mengen - bis zu 19 Liter - Leichengalle. Er betrachtete die Aminosäuren, die er in der Galle fand, als "Abfallprodukte, deren sich der Organismus beim Umbau artfremden Eiweißes in arteigenes entledigt."

Auch WORM, der die Galle auf Cholin und cholinhaltige Bestandteile untersuchte, konnte 1939 Glykokoll darin feststellen.

In operativ gewonnener, frischer, menschlicher Blasengalle wiesen RISSEL und WEWALKA (1952), auf papierchromatographischem Wege, große Mengen von Taurin und Cystin, sowie Spuren von Alanin, Leucin, Valin und Glykokoll nach.

Schließlich stellten KNEDEL und NEIKES (1956), ebenfalls in frischer, menschlicher Blasengalle, folgende Aminosäuren und Amine fest: Alanin, Asparagin-Säure, Cystin/Cystein, Glutamin, Glutamin-Säure, Glykokoll,

Histamin, Ornithin, Taurin, Threonin, Thyramin, Leucin/Isoleucin, Lysin, Methionin und Valin, außerdem fanden sie auf den Chromatogrammen einen Fleck, den sie nicht identifizieren konnten. Bei einem Gallenblasenhydrops gelang ein Nachweis von Aminosäuren jedoch nicht.

Das Vorhandensein von Aminosäuren in der Galle war schon durch die ersten Versuche HAMMARSTENS klar geworden. Man wußte nur nicht, um welche es sich handelte. Es ist zu erwarten, daß es im wesentlichen die gleichen Aminosäuren sind, die auch in der Leber und im Pankreas vorkommen (Tabelle 3).

Allgemeines über die Aminosäuren

Aminosäuren sind im Organismus teils frei, teils als Verbindungen zu finden und erfüllen wichtige Aufgaben. Die größte Bedeutung haben sie als Bausteine des Eiweißes. Bis jetzt sind 22 Aminosäuren aus Eiweißkörpern isoliert worden (WISS, 1954). Als wichtigste davon werden die α -Aminosäuren: Alanin, Glykokoll, Cystin, Cystein, Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan und Histidin angesehen.

Zwischen Aminosäuren und Körperproteinen besteht während des ständigen Auf- und Abbaus der Proteine ein Gleichgewicht. Wenn einzelne molekuläre Umwandlungen gestört sind, kommt es zu schweren klinischen Symptomen (Fanconi 1956).

Durch den ständigen fermentativen Ab- und Umbau werden aus dem Eiweiß Aminosäuren frei, die dann für andere Aufgaben zur Verfügung stehen.

Der Abbau des zugeführten Eiweißes erfolgt stufenweise im Magen-Darm-Trakt, unter Einwirkung von Pepsin und den beiden Fermentgruppen: Trypsin und Erepsin, die im Pankreassaft vorkommen (ROSEMANN, 1950). Er beginnt im Magen mit der Spaltung zu Polypeptiden, welche dann im Darm, unter Einwirkung von Trypsin, zu einfachen Peptiden und schließlich durch das Erepsin des Darmes (WALDSCHMIDT-LEITZ und HARTEN-ECK, 1931) in die einzelnen Aminosäuren zerlegt werden. Die Pepsin-Trypsin-Erepsin-Verdauung vermag das Eiweiß restlos in reine Aminosäuren zu trennen (ROSEMANN, 1950).

Die Aminosäuren können von der Darmschleimhaut resorbiert und über das Serum den Organen zugeführt werden (FELIX und SCHÜTTE, 1949). Nur ein kleiner Teil wird von der Niere mit dem Harn ausgeschieden (NEUBAUER, 1928).

Eine Anzahl der übrigen Aminosäuren erfährt einen weiteren Abbau. Sie können durch Einbüßen ihrer CO_2 -Gruppe in Amine übergehen, an deren Entstehung bestimmte Organfermente, wie z. B. die Histidin-Dekarboxylase in Niere und Leber beteiligt sind (AMMON und DIRSCHERL, 1948). Außerdem kommen sie durch Bakterien bei der Eiweißfäulnis im Dickdarm zustande. Diese Amine spielen teilweise als Geweshormone eine wesentliche Rolle (HOLTZ, 1950).

Beim Abbau der Aminosäuren werden neben der Aminogruppe auch die Methylgruppe, der Phenolring und der Indolring frei, die alle für den Stoffwechsel Bedeutung haben (WEWALKA, 1956).

Die Inneren Organe: Leber, Milz, Niere und Pankreas haben die Fähigkeit, große Mengen von Aminosäuren zu speichern (WISS, 1954). In der Leber kann daraus ein Eiweißvorrat gebildet werden (WHIPPLE, 1941), aus welchem das Plasma-Albumin hervorgeht. Bei Bedarf werden alle Organe von hier aus mit "Roheiweiß" beliefert (SIEDE, 1955).

Außer Strukturproteinen werden aus Aminosäuren in der Leber hauptsächlich Harnstoff und Fermente gebildet. Überschüssige Aminosäuren werden innerhalb von 2 bis 3 Stunden wieder abgegeben; in Niere, Pankreas und Milz dagegen, können sie länger liegen bleiben (van SLYKE, 1913). Aus diesen Aminosäuren werden im Bedarfsfalle Porphyrine, Purine, Pigmente und Hormone aufgebaut (WEWALKA, 1956).

Bei genügendem Angebot an Brenztraubensäure kann die Leber Ammoniak, auf Kosten der Harnstoffbildung, auch zur Herstellung von Aminosäuren verwenden. Dieser Vorgang ist umkehrbar, so daß der Körper auf diesem Wege Aminosäuren auf- und abbauen kann (KNOOP, 1944). Der Abbau, ~~der als oxydative~~ Desaminierung bezeichnet wird, vollzieht sich über Iminosäuren zu α -Ketosäuren, unter Anwesenheit und Verbrauch von O_2 in der Leber (KREBS, 1932) und in geringem Maß auch in der Niere.

Unter Einwirkung von Fäulnisbakterien kommt es im Darm zur reduktiven Desaminierung, dabei entstehen Ausgangsstufen von Fettsäuren.

Eine weitere Bedeutung der Aminosäuren für den Organismus liegt in der Aufrechterhaltung der Stickstoff-Bilanz. Wesentlich ist noch das Verhältnis der Aminosäuren untereinander, da bei Überschuss einer Aminosäure eine Einbauhemmung anderer Aminosäuren erfolgt. Außerdem kann der Körper nur einen Teil davon synthetisieren und zwar durch Umbau von essentiellen Aminosäuren, die ihm mit der Nahrung zugeführt werden müssen. Dies sind:

Valin,	Threonin,	Tryptophan,	Isoleucin,
Leucin,	Methionin,	Lysin,	Phenylalanin.

Die Transaminierung erfolgt in der Leber unter besonderer Beteiligung der Glutaminsäure. Diese liefert neben dem Stickstoff für Alanin und Asparaginsäure, aus den Vorstufen des Zitronen-Säure-Zyklus', auch das Kohlenwasserstoff-Skelett für Prolin, Oxyprolin, Serin, Glykokoll, Cystin, Cystein und Arginin. Die Glutaminsäure selbst wird als einzige Aminosäure im Gehirn ab- und umgebaut und fördert dort die Gewebsatmung. Eine Störung des Glutaminsäure-Stoffwechsels hat schwerwiegende Folgen für die Funktionen des Gehirns (WEWALKA, 1956).

An den Entgiftungsvorgängen in der Leber sind alle essentiellen Aminosäuren maßgeblich beteiligt (FELIX, 1949), besonders aber Methionin (HARTMANN, 1949) und nach neuesten Erkenntnissen die Glutaminsäure zur NH_4 -Entgiftung (SIEDE, 1955).

Die Stickstoff-Bilanz kann dabei sowohl durch zu wenig, als auch durch zu viele Aminosäuren gestört werden. Schon bei Entzug einer essentiellen Aminosäure kommt es zur Amino-Acidurie (BICKEL, 1956). Auch der Ausfall, oder das Fehlen von Fermenten der Leber, welche für den Abbau von Aminosäuren, oder deren Stoffwechselprodukten, wichtig sind, hat Stoffwechselstörungen zur Folge, die sich z. B. in der Phenylketonurie, der Cystinurie und ähnlichen Erscheinungen äußern. Da die Leber die wichtigste Rolle im Aminosäure-Stoffwechsel spielt, wirken sich Störungen oder Erkrankungen dieses Organs am stärksten aus. Bei Hepatitis kann eine Parallelität zwischen der Schwere der Krankheit und der Aminosäure-Ausscheidung im Urin bestehen. Der Aminosäure-Spiegel des Serums ist dabei keinen größeren Schwankungen unterworfen (HEIN und KAFFANKE, 1956).

Tabelle 1: Freie Aminosäuren in Körperflüssigkeiten

	Blut- plasma	Blut- serum	Urin	Magen- saft	Duoden.- saft	Liquor cer.sp.
Asparagin-S.	-	-	-	-	+	-
Glutamin-S.	-	-	-	-	+	+
Glutamin	-	-	-	-	-	+
Lysin	+	+	+	-	+	-
Arginin	+	+	-	-	+	-
Histidin	+	+	-	-	-	+
Tyrosin	-	+	-	-	+	-
Tryptophan	-	+	-	-	-	-
Phenylalanin	-	+	-	-	-	-
Prolin	-	-	-	-	+	-
Cystin	-	+	-	-	+	-
Methionin	+	+	-	-	-	-
Leucin	+	+	+	+	+	+
Isoleucin	+	+	-	-	+	-
Valin	+	+	+	-	+	+
Glykokoll	-	+	+	-	+	+
Alanin	-	-	+	+	+	+
Serin	-	+	-	-	+	+
Threonin	+	+	-	-	+	-
Ergothionein	+	-	-	-	-	-

Sheffner, Schreier,	Decker,	Cagianut, Rissel,	Schönen-
Kirsner, Plück-	Riffart,	Zehnder, Wewalka	berg
Palmer thun	Wagner	Nager	1952
1948	1950	1951	1955

Tabelle 2: Aminosäuren in Protein-Hydrolysaten

	Wachstum- Hormon der Hypophyse	Haemo- globin A	Makro- globuline	Dentin- protein
Asparagin-S.	+	+	-	+
Glutamin-S.	+	-	-	-
Lysin	-	+	+	+
Arginin	+	+	+	+
Histidin	+	+	+	+
Tyrosin	-	+	+	+
Tryptophan	+	-	-	-
Phenylalanin	-	+	+	+
Oxyprolin	-	-	-	+
Prolin	+	+	-	+
Cystin	+	+	+	+
Methionin	+	-	+	+
Leucin	-	+	+	+
Isoleucin	-	+	+	+
Valin	+	+	+	+
Glykokoll	+	+	-	+
Alanin	+	+	-	+
Serin	+	+	-	+
Threonin	+	+	+	+
Glutamin	-	+	-	+
Hydroxylysin	-	-	-	+
	Li und Chung 1956	Jonxis, Huisman u. a. 1956	Bürkmann, Sandkühler u. a. 1956	Hess, Lee u. Neidig 1953

Tabelle 3: Aminosäure-Aufbau einiger Organ-Proteide des Menschen in g%
nach Mütting und Wortmann (1954)

	Leber	Niere	Neben- niere	Milz	Lunge	Pan- kreas	Herz- muskel	Skelett- muskel	Schild- drüse	Hypo- physe	Kno- chen- mark	Pla- centa
Asparagin-Säure	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Glutamin-Säure	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
Lysin	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Arginin	+	+	+	++	++	++	++	++	+	++	+	+
Histidin	++	++	++	++	++	++	++	++	+	++	++	++
Tyrosin	++	+	++	+	++	++	+	++	+	+	++	++
Tryptophan	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+
Phenylalanin	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Oxyprolin	-	-	-	-	-	+	+	++	++	-	-	++
Prolin	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Cystin	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Methionin	++	+	+	++	+	+	++	+	+	+	+	+
Leucin	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Isoleucin	++	+	+	+	++	+	++	++	+	+	+	+
Valin	++	++	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Glycin	+	+	++	++	++	++	+	++	++	+	+	++
Alanin	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Serin	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Threonin	+++	++	++	++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

0 - 2,5 g% = + 7,5 - 10,0 g% = ++++
 2,5 - 5,0 " = ++ 10,0 - 12,5 " = +++++
 5,0 - 7,5 " = +++ 12,5 - 15,0 " = ++++++

Durch Zufuhr von Eiweiß mit Nahrung wird der Aminosäure-Gehalt des Blutplasmas und des Serums für 24 Stunden erhöht. Dabei ist der Anstieg der einzelnen Aminosäure-Werte sehr verschieden und nicht vom Gehalt dieser Aminosäure im zugeführten Protein abhängig (Schreier und Remsperger 1952). Durch die große Zahl von Umwandlungen haben die Aminosäuren auf den Gesamtstoffwechsel einen viel stärkeren Einfluß als stickstofffreie Nahrungsstoffe. Bei Aufnahme von Aminosäuren ist ein Ansteigen des Gesamtstoffwechsels zu beobachten (ABDERHALDEN, 1948). Wenn Leucin, Isoleucin und Methionin in großen Mengen im Plasma vorhanden sind, verursachen sie eine Verminderung des Einbaues einzelner anderer Aminosäuren ins Eiweiß (HIER, 1947).

Das übermäßige Angebot einer Aminosäure soll das wirksame System der Aminosäure-Aufnahme, in die Zelle, blockieren (LANG, 1952), deshalb müssen, bei der parenteralen Zuführung, die Aminosäuren in einem bestimmten Mengenverhältnis zueinander stehen. Die Motorik und der Tonus des Magen-Darm-Kanals sollen durch intravenöse Infusion von Aminosäuren herabgesetzt werden (WESTON, OPPENHEIMER, LEARNER und STAUFFER, 1943). Das Hungergefühl wird dadurch genau so gestillt, wie durch die perorale Aufnahme der gleichen Eiweißmenge (ELMAN, 1948).

Die Ergebnisse der Untersuchungen von Körperflüssigkeiten auf ihren Aminosäure-Gehalt, sind aus den Tabellen 1, 2 und 3 ersichtlich.

Die Galle und ihre Bestandteile

Für die Bestimmung des Aminosäure-Gehalts der Galle kann nur reine Blasen- oder Lebergalle verwendet werden, weil diese allein das ausschließliche Produkt der Leber ist. (In Duodenalgalle sind neben Blasen- und Lebergalle auch Magen-, Duodenal- und Pankreassaft enthalten, welche durch ihren eigenen Gehalt an Aminosäuren eine Beurteilung nicht zulassen.) Reine Galle kann also nur operativ oder aus Gallengangsfisteln gewonnen werden.

Nach neuesten Untersuchungen von POLONOVSKI und BOURRILLON (1952) ist die Gallenflüssigkeit folgendermaßen zusammengesetzt:

	Lebergalle		Blasengalle	in g/l
Wasser	967	- 977	820	
Trockensubstanz	23	- 33	180	
Gesamt-N	0,7	-- 0,9	4,9	
Gesamt-P	0,1	-- 0,2	1,4	
Cholin	0,4	- 0,9	5,5	
gallensaure Salze	7	- 14	115	
Fettsäuren	1,6	- 3,4	24	
Lezithin	1,0	- 5,8	35	
Cholesterin	0,8	- 2,1	4,3	
Protein	1,4	- 2,7	4,5	
Bilirubin	0,32	- 0,62	1,4	
Gesamt-Kohlehydr.	0,4	- 0,9	2,4	
reduzierende Zucker	0,2	- 0,5	0,8	

Die Galle enthält also Cholate, Gallenfarbstoffe, Alkali- und Erdalkali-Salze, weiterhin Spuren von Schwermetallen, Aminosäuren, Muzin (neben anderen Proteinen), Phosphatasen, gepaarte Glukuron- und Schwefelsäuren, Lezithin und Cholesterin und zahlreiche andere endogene und exogene Ausscheidungsprodukte. Insgesamt sind in der Lebergalle des Menschen etwa 2 - 3%, in der Blasengalle 16 - 17 % feste Stoffe enthalten. Proteolytische und lipolytische Fermente kommen in der Gallenflüssigkeit praktisch nicht vor (HINSBERG und BRUNS, 1955). In der Gallenblase werden Wasser und Gallensäuren rückresorbiert, dabei kommt es zur Einengung bis auf 1/10 des Volumens.

Wichtige Bestandteile der Galle sind die Gallensäuren, die meist als "gepaarte Gallensäuren" in Verbindung mit Glykokoll und Taurin, als Glyko- und Tauro-Säuren vorkommen. In manchen Fällen wurde eine säureamidartige Verknüpfung der Komponenten, zu Glykochol- und Taurochol-Säuren, bewiesen. Die Gallensäuren werden in der Leber gebildet. Sie haben die Fähigkeit, unlösliche Stoffe in einen Zustand der Lösung oder Dispersion zu bringen, in dem sie von der Darmschleimhaut aufgenommen werden können (TSCHESCHE und REUBER, 1955). Sie kommen in der Galle auch vielfach in Form ihrer Alkalisalze, hauptsächlich als Glyko- und Taurocholate vor. Der Gehalt an Glykocholaten soll et-

was mehr als das dreifache von den Taurocholaten ausmachen (HINSBERG und BRUNS, 1955), jedoch kommen Schwankungen vor, die teilweise nahrungsbedingt sind.

Die Methode der allgemeinen Papierchromatographie

Der Nachweis von Aminosäuren war früher nur mit komplizierten chemischen Methoden möglich, dafür wurden große Mengen von Untersuchungsmaterial gebraucht, welche in manchen Fällen gar nicht zu beschaffen waren. Seitdem die Papierchromatographie von CONSDEN, GORDON und MARTIN (1944) entwickelt wurde, ist es möglich, Aminosäuren mit einem Minimum an Zeit und Aufwand in komplexen Gemischen nachzuweisen. Es konnten beispielsweise bereits 22 Aminosäuren in 200-400 γ Protein nachgewiesen werden (TURBA, 1954).

Die Papierchromatographie ging aus der Verteilungschromatographie hervor, welche 1941 - 1943 von MARTIN, GORDON und SYNGE zur Trennung von hydrophilen Stoffen, besonders von Aminosäuren, entwickelt worden war. Sie eignet sich speziell zur Analyse von Insulin und Gramicidin, während die Papierchromatographie vor allem zur Darstellung der Eiweißbausteine entwickelt wurde.

Im wesentlichen stellt die Papierchromatographie einen Verteilungsvorgang zwischen einer wäßrigen stationären und einer beweglichen organischen Phase dar. Die zu trennenden Stoffe müssen wenigstens teilweise wasserlöslich sein, weil sie sonst vom feuchten Papier nicht festgehalten werden und keine umschriebenen Flecke bilden (CRAMER, 1953). Das Verfahren diente ursprünglich nur der qualitativen Bestimmung. Später wurden auch Methoden für quantitative Auswertungen entwickelt (CONSDEN 1947, MOORE und STEIN 1948, NAFTALIN 1948, BOISSONAS 1950, GIRI u.a. 1952, HILLER u.a. 1952 usw.), trotzdem bleibt die Papierchromatographie dem qualitativen Nachweis vorbehalten; es wird auch davor gewarnt, sie zu überfordern (TURBA 1954, SCHÖNENBERG 1956).

Bei der Durchführung der Methode dient Filtrierpapier von bestimmter Qualität als stationäre Phase. In den meisten Fällen wird Schleicher & Schüll-Papier Nr. 2043, oder das englische Whatman Nr. 1, verwendet.

Als bewegliche Phase werden organische Lösungsmittel benutzt, die nur teilweise mit Wasser mischbar sind, z. B. Phenol, Collidin, Butanol und Picolin. Von der Untersuchungsflüssigkeit wird mit einer Pipette eine geringe Menge auf das Papier aufgetragen und getrocknet. Dieser "Startpunkt" muß einige Zentimeter vom Rande des Papiers entfernt sein. Je nach dem Gehalt der Lösung an Substanzen wird öfter aufgetragen und dazwischen getrocknet, damit der Fleck die Größe von 1 - 2 cm nicht überschreitet. Bei der eindimensionalen Papierchromatographie wird die Untersuchungsflüssigkeit in Form eines Striches aufgetragen, der etwa 3 cm vom Rand des Bogens entfernt sein muß. Das Papier wird zunächst zum Equilibrieren in das Steiggefäß gebracht - es soll mit Wasser- und Lösungsmitteldampf gesättigt werden - und dann in die Steigflüssigkeit hineingestellt. Diese wandert nun am Papier hoch und zieht die Untersuchungslösung mit, welche auf Grund der verschiedenen Wanderungsgeschwindigkeit ihrer Komponenten getrennt wird. Wenn das Lösungsmittel nahezu den oberen Rand des Bogens erreicht hat, entfernt man diesen aus dem Gefäß und trocknet ihn, nachdem die Steigfront markiert wurde. Im Anschluß daran kann das Chromatogramm durch Besprühen mit einem Reagens angefärbt werden, dadurch werden die einzelnen Komponenten sichtbar.

Ninhydrin-Lösung ist für das Anfärben von Aminosäure-Chromatogrammen am gebräuchlichsten; damit lassen sich schon geringste Mengen (5 γ) von Aminosäuren nachweisen. Mit der Ninhydrinfärbung können außer den α -Aminosäuren einige aliphatische Amine, sowie θ , γ , δ und ϵ -Aminosäuren dargestellt werden (DENT 1948). CRUMPLER und DENT (1949) empfehlen, zur Ausschaltung der α -Aminosäuren das Filtrierpapier mit basischem Kupfer-Karbonat zu bestäuben.

Zweidimensionale Chromatogramme werden nach dem ersten Trocknen um 90° gedreht und einem zweiten Lösungsmittel ausgesetzt. Erst nachdem dieses hochgestiegen ist und getrocknet wurde, werden die Aminosäuren sichtbar gemacht. Für das zweidimensionale Verfahren wird meist in der einen Richtung Phenol, in der anderen Butanol-, Collidin- oder Picolin-Lösung genommen. Da Phenol die Aminosäuren zersetzt, muß bei seiner Anwendung eine längere Versuchsdauer vermieden werden (TURBA 1954).

Nähere Angaben über Technik und Reagenzien der Papierchromatographie sind in der Fachliteratur von CRAMER und TURBA zu finden.

Methode der speziellen Papierchromatographie bei Galle

Die Galle erschwert die papierchromatographische Untersuchung durch ihren Gehalt an Mucin und Farbstoffen. Stark mucinhaltige Blasengalle kann mit dieser Methode kaum getrennt werden, während Lebergalle oft keinerlei Schwierigkeiten macht.

Es werden verschiedene Möglichkeiten angegeben, wie diese störenden Substanzen aus der Gallenflüssigkeit zu entfernen sind, um eine einwandfreie Auftrennung zu erreichen.

RISSEL und WEWALKA (1952) haben Galle zu diesem Zweck ultrafiltriert oder die Aminosäuren mit 70 %igem Alkohol herausgezogen.

KNEDEL und NEIKES (1956) entwickelten für die Vorbehandlung von Galle eine eigene Methode. Die Blasengalle wurde mit Trichloressigsäure, Chloroform, Äther und Humanalbumin der Reihe nach versetzt und dazwischen mehrmals 10 - 20 min lang bei 6000 U/min zentrifugiert, sowie im Vakuum von 5×10^{-3} Torr und Temperatur-Gefälle von $+20^{\circ}$ auf -78° auf 1/30 bis 1/50 eingeengt. Sie berichten, daß die Galle nach abschließender Elektrodialyse ein farbloses Substrat war, das sich chromatographisch leicht darstellen ließ.

Bei der Durchführung der papierchromatographischen Versuche mit Galle wurde von den bisherigen Untersuchern im wesentlichen auf die gleiche Art vorgegangen.

RISSEL und WEWALKA benutzten die aufsteigende Methode und arbeiteten mit Filtrierpapier Whatman Nr. 1. Als Lösungsmittel wurden: Phenol, Collidin-Lutidin-Wasser, Lutidin-Wasser und n-Butanol-Eisessig-Wasser verwendet; es wurde mit Ninhydrin angefärbt und zum Identifizieren Test-Aminosäure-Lösungen zugesetzt. Zum Sichtbarmachen von Cystin und Methionin wurde mit H_2O_2 oxydiert.

KNEDEL und NEIKES versetzten das vorbehandelte Gallen-Substrat ebenfalls mit H_2O_2 und chromatographierten auf Filtrierpapier 2043a mgI der Firma Schleicher & Schüll. Als Lösungsmittel fanden Phenol und Butanol-Eisessig-Wasser Anwendung. Das Sichtbarmachen erfolgte mit den nachstehenden spezifischen Färbungen: Pauly'sche Diazo-Reaktion (mit Bromanilin), Nessler's Reagens + Perjodsäure, Natrium-Nitroprussid in 25 %iger NH_3 -Atmosphäre + KCN, Platinchlorid und Natriumjodid,

p-Dimethylaminobenzaldehyd, Isatin und die Färbung nach Sakaguchi.

Die papierchromatographischen Untersuchungen von Galle, die für diese Arbeit vorgenommen wurden, galten neben den frei vorkommenden Aminosäuren, bis zu einem gewissen Grade, auch denen, die im Galleneiweiß enthalten sind (DIETRICH und STUMPF 1956).

Die Untersuchungen wurden nach folgendem Schema durchgeführt:

1. Vorversuche:

Bestimmung der Untersuchungsmenge und Arbeitsmethode für ein- und zweidimensionale Papierchromatographie mit Aminosol und Nativgalle.

2. Hauptversuche:

Papierchromatographische Darstellung der freien und gebundenen Aminosäuren in natürlicher und vorbehandelter Leber- und Blasengalle.

3. Identifizieren:

Zusatz von Test-Aminosäure-Lösungen und Sichtbarmachen mit Ninhydrin und spezifischen Färbungen.

Es wurde stets reine Leber- und Blasengalle verwendet, die von 23 Patienten mit Cholelithiasis operativ gewonnen worden war.

Zunächst erfolgten die papierchromatographischen Untersuchungen eindimensional. Dazu wurden die Untersuchungsflüssigkeiten mit 0,1 ml Blutzucker-Pipetten mehrmals strichförmig auf Filtrierpapier aufgetragen und jeweils getrocknet, bis die, für die Untersuchung günstigste Menge erreicht war. Sie wurde von uns durch eindimensionale Vorversuche bestimmt, weil davon die Genauigkeit der Chromatogramme abhängt. Die Methode für die zweidimensionale Chromatographie wurde mit Aminosol-Vitrum, einem Kasein-Hydrolysat der Firna Dr. Remy & Co., Hamburg, festgelegt.

Für die Vorversuche wurde das schnell laufende Schleicher & Schüll-Papier Nr. 2040 a und b benutzt, die Hauptversuche wurden mit Nr. 2043 b mgl durchgeführt. Die Bogen wurden für zweidimensionale Chromatogramme auf eine Größe von 29 x 30 cm, für eindimensionale auf 14,5 x 30 cm zugeschnitten.

Wir wandten die ascendierende Papierchromatographie an und benutzten dazu hohe Standgefäße, an deren Deckel das Papier befestigt werden

konnte. Die Lösungsmittel waren: α -Picolin-Wasser (40:60) und Phenol-Lösung (280,0 Phenol : 120,0 Aqua dest.). Einige Chromatogramme wurden auch mit n-Butanol-Eisessig-Wasser (40:10:50) entwickelt, aber die Trennung war im Verhältnis zu Picolin nicht befriedigend, so daß von einer weiteren Anwendung dieses Lösungsmittels abgesehen wurde.

In die Standgefäße wurde so viel von dem Lösungsmittel gefüllt, daß damit der Boden 2 - 3 mm hoch bedeckt war. Eindimensionale Chromatogramme entwickelten wir nur in Picolin-Lösung, zweidimensionale zuerst in Picolin, dann in Phenol.

Die Bogen wurden etwa 5 Stunden lang zum Equilibrieren in die Gefäße gehängt, anschließend in das Lösungsmittel eingetaucht und 12 - 15 Stunden darin belassen. In dieser Zeit stiegen Picolin und Phenol 25 - 30 cm hoch. Die Chromatogramme wurden dann aus den Gefäßen herausgenommen und getrocknet. Picolin verdunstete innerhalb von 4 Stunden bei Zimmertemperatur, während das Phenol durch Trocknen über dem Heizofen entfernt werden mußte. Erst nach restloser Beseitigung des Lösungsmittels wurde in der zweiten Richtung entwickelt oder angefärbt.

Für die Vorversuche und einen Teil der Hauptversuche wurde zum Sichtbarmachen der Aminosäuren 0,2 %ige Ninhydrin-Lösung in 95 % Butanol und 5 % 2n-Essigsäure benutzt. Die Chromatogramme wurden damit gleichmäßig besprüht und anschließend bei etwa 105° getrocknet, bis die Flecke hervortraten.

Es zeigte sich, daß Papierchromatogramme, die auf diese Art behandelt worden waren, in den folgenden zwei Tagen an Deutlichkeit zunahmen. Vereinzelt wurden in dieser Zeit noch weitere Flecke sichtbar. Nach etwa 8 Tagen begann die Färbung sehr allmählich blasser zu werden.

Außer dem Ninhydrin verwandten wir auch die Isatin-Färbungen nach BARROLIER, HEILMANN und WATZKE (1956). Die entwickelten Chromatogramme wurden mit den Reagenzien getränkt und dann bei Zimmertemperatur getrocknet; dabei traten die Aminosäure-Flecken bunt hervor. Die orange-gelbe Farbe des Isatin wurde durch Wässern annähernd entfernt. Diese Färbung reagiert nur auf größere Mengen von Aminosäuren und ist für Galle wenig geeignet, weil deren chromatographische Trennung bei vergrößerter Auftragsmenge immer schlechter wird.

Deshalb wurde von der weiteren Anwendung dieser Methode abgesehen und bei den folgenden Versuchen Folin's Reagens in der Modifikation von MÜTING (1954) zum Anfärben benutzt. Mit dem frisch bereiteten Reagens (0,2 g Natrium-8-naphthochinonsulfonat und 5 g Natriumkarbonat in Aqua dest. zu 100 ml gelöst) wurden Chromatogramme von Test-Aminosäuren und von Galle besprüht. Bei Zimmertemperatur wurden sehr rasch bunte Flecke sichtbar, deren charakteristische Färbung die Bestimmung der Chromatogramme erleichterte. Da dieses Reagens in seiner Empfindlichkeit dem Ninhydrin nahekommt, eignet es sich für Galle sehr gut.

Für die endgültigen Bestimmungen unterzogen wir die Galle einer schonenden Vorbehandlung. Die freien Aminosäuren wurden durch Dialyse aus der Galle entfernt. Zu diesem Zweck wurden 10 ml frische Galle in einen Dialysierschlauch (Firma Kalle, Wiesbaden-Biebrich) gefüllt und in 15 ml Aqua dest. gehängt. Dies wurde 48 Stunden lang im Eisschrank bei 2 - 4° aufbewahrt. Nach dieser Zeit war der größte Teil der Aminosäuren in das Wasser diffundiert, welches dann im Vakuum auf etwa 1/5 eingengt wurde. Das Chromatographieren der Lösung erfolgte in der beschriebenen Weise.

Zur Darstellung der Protein-Bausteine war ein Gallenhydrolysat erforderlich. Wir versetzten Nativgalle im Verhältnis 1 : 1 mit 17 %iger Salzsäure und kochten sie 7 Stunden lang im Rückflußkühler. Das Ergebnis war eine homogene, bräunliche Flüssigkeit.

Die Bestimmung der gefundenen Muster wurde mit Hilfe von Test-Lösungen vorgenommen, welche aus reinen, chemischen Aminosäuren der Firmen Merck, Darmstadt, und Bayer, Leverkusen, hergestellt wurden: Jeweils 10 mg Aminosäuren wurden in 2 ml Aqua dest. gelöst. Diese Lösungen ließen wir zunächst einzeln, später gruppenweise ein- und zweidimensional laufen und bestimmten danach die R_f -Werte und die Lagebeziehungen zueinander. Auf Grund der erhaltenen Ergebnisse setzten wir den Untersuchungsflüssigkeiten die entsprechenden Test-Lösungen einzeln zu und kamen dadurch zu einer exakten Bestimmung der Muster unserer Chromatogramme. Zum Sichtbarmachen von Cystin wurde den Versuchslösungen H_2O_2 zugesetzt.

Ergebnisse

Wie schon erwähnt, wurden die günstigsten Untersuchungsmengen jeweils durch eindimensionale Versuche bestimmt. Bei Lebergalle betrug diese Menge ziemlich konstant 1,5 ml für eindimensionale und 1,2 ml für zweidimensionale Chromatographie. Bei Blasengalle schwankte sie, je nach dem Grade der Eindickung, zwischen 0,2 und 1,0 ml. Pathologisch stark veränderte und besonders mucinhaltige Blasengalle war für die Versuche nicht brauchbar.

Die Galle lieferte im eindimensionalen Chromatogramm, neben 3 Pigment-Streifen 8 - 9 deutliche ninhydrinpositive Zonen. Bei der zweidimensionalen Chromatographie entstanden Muster von 7 - 9 Flecken, welche mehr oder weniger durch den jeweiligen Gallenfarbstoff-Gehalt unterbrochen wurden.

Durch Zusatz von Test-Aminosäuren und Anfärben mit Ninhydrin und teilweise auch Folin's Reagens, konnten folgende Aminosäuren identifiziert werden: Alanin, Cystin, Glykokoll, Leucin, Taurin und Valin. In den meisten Fällen außerdem: Asparagin-Säure, Glutamin-Säure und Methionin und manchmal Lysin.

Bei dem Gallen-Dialysat war die Menge von 0,30 - 0,35 ml zur eindimensionalen und 0,25 - 0,30 ml zur zweidimensionalen Darstellung nötig. Die eindimensionalen Chromatogramme wiesen 7 - 10 gefärbte Zonen auf. Je nach dem Farbstoffgehalt der Galle waren 2 Pigmentstreifen mehr oder weniger deutlich zu sehen, sie störten aber die Bestimmung in keiner Weise. Die zweidimensionale Untersuchung des Dialysates ergab Chromatogramme, die bis zu 9 Aminosäure-Flecken aufwiesen. Gallenfarbstoffe waren darauf kaum zu erkennen. Auch diese Chromatogramme wurden mit Hilfe von Test-Lösungen identifiziert, welche bei den ein- und zweidimensionalen Untersuchungen einzeln zugesetzt wurden. Nach dem Anfärben konnten folgende Aminosäuren bestimmt werden: Alanin, Cystin, Glutamin-Säure, Glykokoll, Leucin, Methionin, Taurin und Valin, außerdem oft Asparagin-Säure und manchmal Lysin.

grün

Leucin

Methionin

Valin

Taur./Cyst.

gelbl.

Alanin

gelb

Glykokoll

Glutam.S.

Asparag.S.

Lysin

Abb. 1: Verteilung der Zonen bei einem eindimensionalen Chromatogramm von frischer Lebergalle.

Auf der linken Seite ist die Lage und Tönung der Gallenfarbstoffe angegeben.

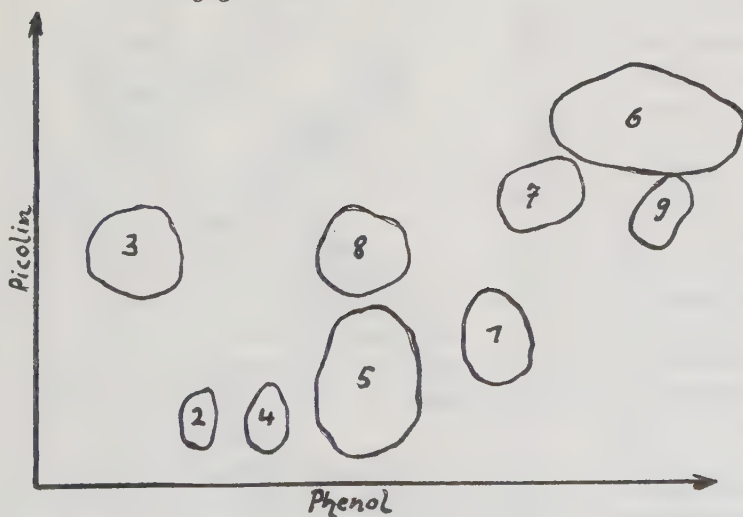


Abb. 2: Muster eines zweidimensionalen Chromatogramms von dialysierter Lebergalle.

1 = Alanin, 2 = Asparagin-S., 3 = Cystin, 4 = Glutamin-S.,

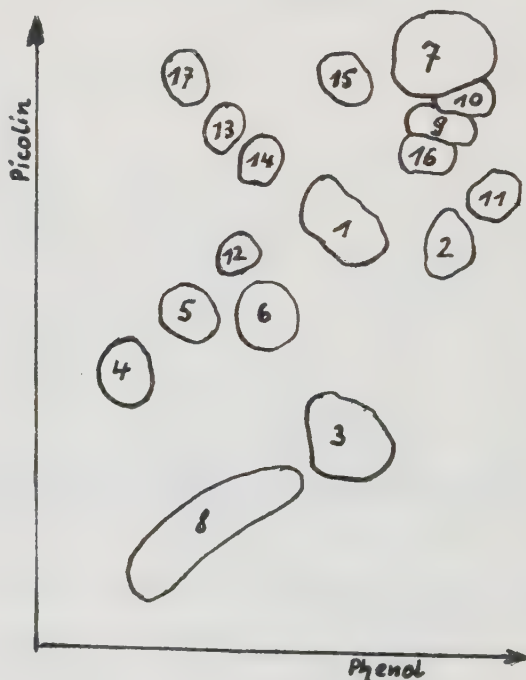
5 = Glykokoll, 6 = Leucin, 7 = Methionin, 8 = Taurin, 9 = Valin.

Für die chromatographische Untersuchung des Gallen-Hydrolysates genügte das Auftragen von 0,02 ml hydrolysierten Blasengalle, oder 0,2 ml hydrolysierten Lebergalle. Während die Untersuchung von frischer Leber- und Blasengalle die gleichen Muster von freien Aminosäuren ergab, differierte der Aminosäure-Gehalt der hydrolysierten Lebergalle sehr von dem des Blasengalle-Hydrolysates.

Die eindimensionalen Chromatogramme der hydrolysierten Blasengalle enthielten viele gefärbte Zonen, die aneinander grenzten und sich teilweise überlagerten, so daß ihre Anzahl nicht festzustellen war. Die zweidimensionale Untersuchung lieferte sehr klare Muster von 16 - 17 ninhydrinpositiven Flecken, die identifiziert wurden als : Alanin, Aminobuttersäure, Arginin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Glykokoll, Leucin, Lysin, Methionin, Phenylalanin, Prolin, Serin, Taurin, Threonin, Tyrosin und Valin.

Abb. 3: Muster eines zweidimensionalen Chromatogramms von hydrolysierten Blasengalle.

1 = Alanin,
2 = Aminobuttersäure, 3 = Arginin, 4 = Asparaginsäure, 5 = Glutaminsäure, 6 = Glykokoll, 7 = Leucin, 8 = Lysin, 9 = Methionin, 10 = Phenylalanin, 11 = Prolin, 12 = Serin, 13 = Taurin, 14 = Threonin, 15 = Tyrosin, 16 = Valin, 17 = nicht identifiziert.



Die Chromatogramme der hydrolysierten Lebergalle wiesen 11 gefärbte Zonen, bzw. Flecke auf, von denen 10 folgendermaßen bestimmt wurden: Alanin, Asparagin-Säure, Glutamin-Säure, Glykokoll, Leucin, Lysin, Methionin, Serin, Taurin und Valin.

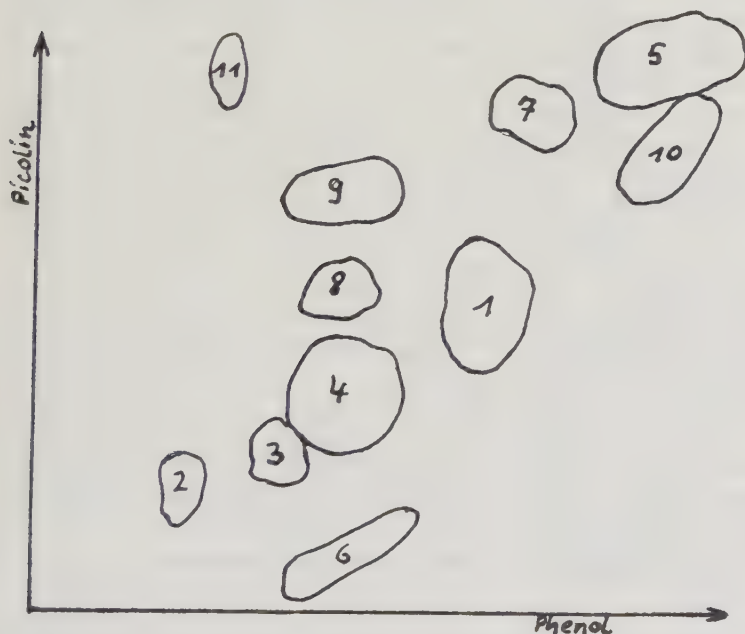


Abb. 4: Muster eines zweidimensionalen Chromatogramms von hydrolysierten Lebergalle.

1 = Alanin, 2 = Asparagin-Säure, 3 = Glutamin-Säure, 4 = Glykokoll, 5 = Leucin, 6 = Lysin, 7 = Methionin, 8 = Serin, 9 = Taurin, 10 = Valin, 11 = nicht identifiziert.

Vergleicht man die Chromatogramme in Richtung auf die Größe und Intensität der Farbflecke, so zeigt sich, daß das Mengenverhältnis der Aminosäuren bei verschiedenen Patienten variiert. Speziell bei Taurin und Glykokoll wechselte die Menge, soweit aus der Farbfleckengröße darauf geschlossen werden darf; in den meisten Fällen war jedoch der Fleck des Glykokoll intensiver gefärbt und größer als der von Taurin.

Tabelle 4: Aminosäuren in der Galle

	Ergebnisse der Chem. Unters.		Ergebnisse der papierchromatographischen Untersuchungen				
	Hammarsten	Müller	Wewalka und Rissel	Knedel und Neikes	eigene Untersuchungen		Hydrolysat von: Leberg. Blaseng.
					Nativ-galle	Dia-lysat	
Alanin	-	-	+	+	+	+	+
Asparagin-S.	-	-	-	+	+	+	+
Cystin/Cystein	-	-	+	+	+	+	-
Glutamin	-	-	-	+	-	-	-
Glutamin-S.	-	-	-	+	+	+	+
Glykokoll	+	+	+	+	+	+	+
Histamin	-	-	-	+	-	-	-
Leucin/Isoleuc.	-	+	+	+	+	+	+
Lysin	-	+	-	+	+	+	+
Methionin	-	-	-	+	+	+	+
Ornithin	-	-	-	+	-	-	-
Taurin	+	-	+	+	+	+	+
Threonin	-	-	-	+	-	-	-
Tyramin	-	-	-	+	-	-	-
Valin	-	+	+	+	+	+	+
Tyrosin	-	+	-	-	-	-	-
Arginin	-	-	-	-	-	-	-
Aminobutters.	-	-	-	-	-	-	-
Phenylalanin	-	-	-	-	-	-	-
Prolin	-	-	-	-	-	-	-
Serin	-	-	-	-	-	-	+

Besprechung der Ergebnisse

Bei der papierchromatographischen Darstellung der Gallenflüssigkeit von Gallensteinkranken schwankte der Gehalt an freien Aminosäuren nur gering. Die sogenannten freien Aminosäuren wurden im allgemeinen in frischer Galle oder im Dialysat nachgewiesen. In einigen Fällen wurde aber auch Galle untersucht, die mehrere Wochen lang bei Temperaturen von 18° - 25° aufbewahrt worden war. Die Untersuchungen, die allerdings nur eindimensional erfolgten, lieferten die gleichen Ergebnisse, wie bei der frischen Galle; dies kann als ein Beweis dafür angesehen werden, daß in der Galle eine Proteolyse kaum stattfindet, jedenfalls, auf Grund des Aminosäure-Gehaltes, nicht sicher nachweisbar ist.

Die Untersuchung der, mit 17 %iger Salzsäure, hydrolysierten Galle, führte zu der Annahme, daß einige Aminosäuren nur als Verbindungen in der Galle enthalten sind. Da Tryptophan, Glutamin und Cystin durch die Säure-Hydrolyse geschädigt werden und meist nicht mehr darstellbar sind, können diese Ergebnisse nicht als vollständig bezeichnet werden.

Gegenüber der hydrolysierten Blaserngalle waren in der hydrolysierten Lebergalle, Aminobuttersäure, Arginin, Phenylalanin, Prolin, Threonin und Tyrosin nicht nachweisbar. Das spricht dafür, daß in der Blasengalle außer den Aminosäure-haltigen Verbindungen der Leber noch solche der Glykoproteide (Mucine) enthalten sind.

Wie aus der Tabelle 4 zu sehen ist, divergieren die Ergebnisse der bisherigen papierchromatographischen Untersuchungen von Galle. Als Ursache dafür kann entweder das verschiedenartige Untersuchungsmaterial, oder die Methoden angeschuldigt werden.

Der Vergleich der Methode von RISSEL und WEWALKA, die an anderer Stelle schon beschrieben wurde, mit der, die bei den eigenen Untersuchungen angewandt wurde, zeigt eine weitgehende Übereinstimmung. Es wurde beiderseits frische, operativ gewonnene, Leber- und Blasengalle verwendet. RISSEL und WEWALKA ultrafiltrierten die Blasengalle, oder dialysierten sie gegen 70 %igen Alkohol. Die Lebergalle wurde nicht vorbehandelt. Wir dialysierten Leber- und Blasengalle gegen destilliertes Wasser, untersuchten aber auch Galle, die nicht vorbehandelt war.

Die Methode von KNEDEL und NEIKES unterscheidet sich von den eben genannten vor allem durch die Art der Vorbehandlung der Galle für die

Untersuchung, welche ebenfalls schon beschrieben wurde. Außerdem wurden die Chromatogramme zum Sichtbarmachen und Identifizieren mit den verschiedensten Farbreagenzien behandelt, während sich die anderen Autoren im wesentlichen auf den Gebrauch von Ninhydrin beschränkten und nur bei den eigenen Versuchen vereinzelt Isatin und Folin's Reagens angewandt wurden.

Die eigenen Ergebnisse differieren mit denen von RISSEL und WEWALKA, sowie KNEDEL und NEIKES in folgenden Punkten:

In einigen Fällen gelang es, freies Lysin in der Galle nachzuweisen (KNEDEL und NEIKES kamen zu dem gleichen Resultat), während RISSEL und WEWALKA diese Aminosäure nicht darstellen konnten. Ebenso verhielt es sich mit der Asparagin-Säure, der Glutamin-Säure und dem Methionin, welche auf den meisten eigenen Chromatogrammen, wie auch bei KNEDEL und NEIKES, aber nicht bei RISSEL und WEWALKA vorkamen.

KNEDEL und NEIKES berichten außerdem über freies Threonin, Glutamin, Histamin, Ornithin und Tyramin in vorbehandelter Blasengalle, deren Nachweis weder bei RISSEL und WEWALKA, noch bei dem jetzigen Material gelang. Möglicherweise sind die verschiedenen Ergebnisse zum Teil durch die gleiche Wanderungsgeschwindigkeit mancher Aminosäuren und der Gallenfarbstoffe bedingt, wie anhand von Vergleichen zwischen den Chromatogrammen von Nativgalle und dem Dialysat angenommen werden muß. Es muß auch daran gedacht werden, daß eventuell bei pathologischen Leberprozessen vermehrt Aminosäuren in der Galle auftreten.

Zusammenfassung

Bei 23 Gallensteinkranken wurde operativ gewonnene, reine Blasen- galle, in einigen Fällen auch Lebergalle aus dem T-Drain (Kehr- Drainage) auf ihren Gehalt an Aminosäuren papierchromatographisch untersucht. Außerdem erfolgte bei Dialysaten und Hydrolysaten der Blasen- bzw. Lebergalle eine ein- und zweidimensionale papierchromatographische Auftrennung.

Sowohl in der Nativgalle, als auch in der dialysierten Galle konnten insgesamt 10 Aminosäuren nachgewiesen und identifiziert werden. Diese waren: Alanin, Asparagin-Säure, Cystin, Glutamin-Säure, Glykokoll, Leucin, Methionin, Taurin, Valin und vereinzelt Lysin.

In hydrolysierter Galle gelang der Nachweis von 16 Aminosäuren und zwar Alanin, Aminobuttersäure, Arginin, Asparagin-Säure, Glutamin-Säure, Glykokoll, Leucin, Lysin, Methionin, Phenylalanin, Prolin, Serin, Taurin, Threonin, Tyrosin und Valin.

Die entwickelte Methode und die eigenen Ergebnisse wurden mit denen anderer Autoren verglichen und die aufgetretenen Abweichungen diskutiert.

Zum Abschluß möchte ich Herrn Professor Dr. H. Bronner für die Übernahme des Referates und Herrn Dr. Dr. K.F. Dietrich für seine freundliche Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit meinen herzlichen Dank aussprechen.

Literaturverzeichnis

1. Abderhalden, E.: "15. Vorlesung." Lehrbuch der physiologischen Chemie. Benno Schwabe & Co., Basel 1948, Seite 198
2. Ammon, R. und Dirscherl, W.: "Aminosäuren-Decarboxylasen." Fermente, Hormone, Vitamine, Georg Thieme, Leipzig 1948, S. 226
3. Barrollier, J., J. Heilmann und E. Watzke: "Polychrome Sichtbarmachung von Aminosäuren auf Papierchromatogrammen und -elektrophogrammen." Hoppe-Seyler's Z. 304, (1956), 21.
4. Bickel, H.: "Zum Mechanismus der Aminoacidurie." Schweiz. med. Wschr. (1956), 1265.
5. Boissonnas, R.A.: "Dosage colorimétrique des acides aminés séparés par chromatographie sur papier." Helvet. Chim. Acta XXXIII, (1950), 1975.
6. Bürkmann, I., S. Sandkühler, K. Schreier: "Über den Gehalt von Makroglobulinen an essentiellen Aminosäuren." Ärztl. Forschung 10, (1956), 525.
7. Cagianut, B., K. Zehnder und U. Nager: "Papierchromatographische Analyse des menschlichen Magensaftes." Schweiz. med. Wschr. (1950), 819.
8. Consden, R., A.H. Gordon und A.J.P. Martin: "Qualitative analysis of proteins: a partition chromatographic method using paper." Biochem. J. 38, (1944), 224.

9. Consden, R., A.H. Gordon und A.J.P. Martin:
 "The identification of lower peptides in complex mixtures." *Biochem. J.* 41, (1947), 590.
10. Cramer, F.: "Papierchromatographie."
 Verlag Chemie, Weinheim 1953.
11. Crumpler, H.R. und C.E. Dent:
Nature 164, (1949), 441
12. Decker, P., W. Riffart und H. Wagner:
 "Aminosäure-Bestimmungen im Urin mit Hilfe der zweidimensionalen Papierchromatographie." *Klin. Wschr.* (1951), 420.
13. Dent, C.E.: "A study of behaviour of some sixty amino-acids and other ninhydrin-reacting substances on Phenol-'Collidine' filter-paper chromatograms, with notes as to the occurrence of some of them in biological fluids."
Biochem. J. 43, (1948), 169.
14. Dietrich, K. F. und W. Stumpf:
 "Die Proteine der Galle bei Cholelithiasis." *Klin. Wschr.* (1956), 373.
15. Elman, R.: zit. bei Glatzel "Parenterale Ernährung." *Ergeb. inn. Med. u. Kinderheilk.* Band 6, Springer Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1955, Seite 572.
16. Fanconi, G.: "Aminosäure-Stoffwechsel." 8. Internat. Paediatric-Kongreß, Kopenhagen 1956. *Schweiz. med. Wschr.* (1956), 1264.
17. Felix, K.: zit. bei Siede "Die neuzeitliche Behandlung der schweren Leberinsuffizienz und des Leber-Koma."
Dtsch. med. Wschr. (1955), 1468.

18. Felix, K und E. Schütte:
 "Zur Physiologie des Eiweißes." Wiesbaden
 1949. Kongr. Zentr. Bl. inn. Med. 126,
 (1951), 58.
19. Giri, K.V., A.N. Radhakrishnan und C.S. Vaidyanathan:
 "Some factors influencing the qualitative
 determination of amino-acids separated by
 circular paper chromatography."
 Analyt. Chem. 24, (1952), 1677.
20. Hammarsten, O.: "Gallensaure Alkalien." Lehrbuch der physio-
 logischen Chemie, Bergmann Verlag, Mün-
 chen 1926, Seite 331.
21. Hammarsten, O.: "Zur Chemie der Galle." Asher-Spiro: Ergeb.
 d. Physiologie, 4/1 (1905), 1.
22. Hartmann, F.: "Die Wirkung des Methionin bei Leberin-
 suffizienz." Klin. Wschr. (1949), 31.
23. Hein, L. und Kaffanke, V.:
 "Die funktionsdiagnostische Bedeutung fortlau-
 fender Aminosäure-Bestimmungen im Blut und
 Urin bei kindlicher Hepatitis."
 Ann. paediatr. (Basel), 185, (1955), 348.
24. Hess, W. C., C. Lee und B.A. Neidig:
 "Dentinal protein: amino-acid composition."
 Chem. Abstr. 47, (1953), 2785e.
25. Hier, St. W.: "Influence of ingestion of single amino-acids
 on the blood level of free amino-acids."
 Journ. Biolog. Chem. 171, (1947), 813.
26. Hiller, E., F. Zinnert und G. Frese:
 "Ein Beitrag zur quantitativen Bestimmung
 von Aminosäuren im Papierchromatogramm.
 Biochem. Z. 323, (1952), 245.

27. Hinsberg, K. und F. Bruns:
"Gallensäuren." Hoppe-Seyler-Thierfelder,
Handbuch, 5. Band, Springer-Verlag, Berlin-
Göttingen-Heidelberg 1955, Seite 390.
28. Holtz, F.:
"Amine." Landois-Rosemann, Physiologie
des Menschen; Urban-Schwarzenberg, Mün-
chen-Berlin 1950, Seite 322.
29. Jonxis, J.H.P., T.H.C. Huisman, P.C. van der Schaaf und
H.K. Prins:
"Amino-acid composition of Haemoglobin E."
Nature 177, (1956), 627.
30. Knedel, M. und K. Neikes:
"Papierchromatographische Untersuchungen
über freie Aminosäuren und Amine in der
Galle."
Klin. Wschr. (1956), 1005.
31. Knoop, F.:
zit. bei Wieland "Aufgaben der Leber und
Niere." Landois-Rosemann, s. Nr. 28.,
Seite 321.
32. Krebs, H.A.:
zit. bei Wieland, wie Nr. 31.
33. Lang, K.:
zit. bei Glatzel, wie Nr. 15.
34. Li, C.H. und D. Chung:
"Amino-acid composition of hypophyseal
growth hormone as determined by paper
chromatography of the dinitrophenyl
amino-acids."
Journ. Biolog. Chem. 218, (1956), 33.
35. Martin, A.J.P. und R.L.M. Synge:
"A new form of chromatogram employing two
liquid phases." Biochem. J. 35, (1941),
1358.

36. Moore, St. und W.H. Stein:
 "Photometric ninhydrin method for use in chromatography of amino-acids."
 Journ. Biolog. Chem. 176, (1948), 367.
37. Müller, E.F.W.:
 "Über das Vorkommen von Aminosäuren und freiem Cholin in der Galle."
 Hoppe-Seyler's Z. 242, (1936), 201.
38. Müting, D.:
 "Über eine qualitative Farbreaktion zur Differenzierung von Aminosäuren auf Filtrierpapier."
 Naturwiss. 39, (1952), 303.
39. Müting, D. und V. Wortmann:
 "Zum Aminosäure-Aufbau der Serum- und Gewebeeisweißkörper gesunder Menschen und Tiere."
 Biochem. Z. 325, (1954), 453.
40. Naftalin, L.:
 "Quantitative chromatographic estimation of α -amino-acids." Nature 161, (1948), 763.
41. Neubauer, O.:
 "Die einfachen Eiweißbausteine (Aminosäuren) im Organismus." Bethe-Bergmann: Handbuch der normalen und pathologischen Physiologie. Springer Verlag, Berlin 1928. 5. Band, Seite 279.
42. Polonovski, M. und R. Bourrillon:
 "Etude sur la composition des biles dans la série animale."
 Bull. Soc. Chim. biol. 34, (1952), 703.
43. Rissel, E. und F. Wewalka:
 "Papierchromatographische Untersuchungen über freie Aminosäuren im Duodenalsaft."
 Klin. Wschr. (1952), 1065.

44. Rosemann, H.U.: "Verdauende Wirkung des Magensaftes."
Landois-Rosemann, s. Nr. 28, Seite 274.
45. Schönenberg, H.: "Kritische Bemerkungen zur klinischen
Papierchromatographie der Aminosäuren."
Klin. Wschr. (1956), 269.
46. Schönenberg, H.: "Die Papierchromatographie des Liquor
cerebro-spinalis." Ergeb. inn. Med. u.
Kinderheilk. s. Nr. 15, Seite 138 (1955).
47. Schreier, K. und H. Plückthun:
"Untersuchungen über den Gehalt an freien
Aminosäuren im Serum und Urin."
Biochem. Z. 320, (1950), 450.
48. Schreier, K. und H. Remsperger:
"Über den Einfluß der Nahrungsstoffe auf den
Serumspiegel der einzelnen Aminosäuren."
Biochem. Z. 322, (1952), 298.
49. Sheffner, A.L., J.B. Kirsner und W.L. Palmer:
"Studies on amino-acid excretion in man."
Journ. Biolog. Chem. 175, (1948), 107.
50. Siede, W.: "Die neuzeitliche Behandlung der schweren
Leberinsuffizienz und des Leber-Koma."
Dtsch. med. Wschr. (1955), 1468.
51. Slyke, D.D. van: zit. bei Wiss "Verteilung der Aminosäuren
in den Geweben." Flaschenträger-Lehnartz:
Physiologische Chemie, Band II/1b, Springer-
Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1954,
Seite 916.
52. Tschesche, R. und R. Reuber:
"Gallensäuren." Hoppe-Seyler-Thierfelder,
Handbuch, s. Nr. 27, Band III/2, Seite 1412.

53. Turba, F.: "Chromatographische Methoden in der Protein-Chemie." Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1954, Seite 165.
54. Waldschmidt-Leitz, E. und A. Harteneck:
zit. bei Rosemann "Verdauende Wirkung des Pankreassaftes." Landois-Rosemann, s.Nr.28, S. 282.
55. Weston, Oppenheimer, Learner und Stauffer:
zit. bei Glatzel, wie Nr. 15.
56. Wewalka, F.: Beziehungen zwischen Störungen des Aminosäure-säurestoffwechsels und Leberkrankheiten.
Acta hepatolog. 4, (1956),
57. Whipple:
zit. bei Siede "Die neuzeitliche Behandlung der schweren Leberinsuffizienz und des Leber-Koma."
Dtsch. med. Wschr. (1955), 1468.
58. Wiss, O.: "Die Verteilung der Aminosäuren in den Geweben." Flaschenträger-Lehnartz, s. Nr. 51, Band II/1b, Seite 916.
59. Wiss. O.: "Bildung von Aminosäuren." Flaschenträger-Lehnartz, s. Nr. 51, Band II/1b, Seite 933.
60. Worm, M.: "Über Vorkommen und Menge von Cholin und cholinhaltigen Lipoiden in der Galle." Hoppe-Seyler's Z. 257, (1939), 140.

Lebenslauf

Am 10. Juni 1929 wurde ich als Tochter des Versicherungs-Direktors Carl Schaffry und seiner Ehefrau Maria, geb. Staufenberg, in Hannover geboren, wo ich bis 1940 eine Privatschule und die Wilhelm-Raabe-Oberschule besuchte. Anschließend war ich bis 1945 an Oberschulen in München, Garmisch-Partenkirchen und Reichersbeuern. Nach Kriegsende legte ich, am 17. 7. 1947, an der Oberschule Miesbach/Obb. die Reifeprüfung ab. Bis 1951 war ich zahnärztliche Sprechstundenhilfe und nahm im Winter-Semester 1951/52 in München das zahnmedizinische Studium auf. Im März 1953 legte ich die Vorprüfung ab und beendete im Dezember 1955 das zahnmedizinische Staatsexamen.

Vom 15. Dezember 1955 bis 1. April 1957 war ich als Assistentin in Tegernsee tätig.

CHAPTER II

The first of the most important of the principles of the theory of the mind is the principle of the conservation of energy. This principle states that the total amount of energy in the universe is constant, and that energy can neither be created nor destroyed. This principle is the basis of all the laws of physics, and it is the foundation of the theory of the mind. The second principle is the principle of the conservation of matter. This principle states that the total amount of matter in the universe is constant, and that matter can neither be created nor destroyed. This principle is the basis of all the laws of chemistry, and it is the foundation of the theory of the mind. The third principle is the principle of the conservation of information. This principle states that the total amount of information in the universe is constant, and that information can neither be created nor destroyed. This principle is the basis of all the laws of information theory, and it is the foundation of the theory of the mind.

